

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 20, 1982, pp. 191–201

Konsekutiv-Meßverfahren: Eine Variante zur Richtigkeitskontrolle bei Einzel-, Profil- und Notfallbestimmungen

Von H. G. Eisenwiener und J. M. Kindbeiter

Forschungs- und Entwicklungslaboratorien der Abteilung Diagnostica F. Hoffmann-La Roche + Co. AG, Basel, Schweiz

(Eingegangen am 9. Juli/7. Dezember 1981)

Zusammenfassung: Es wird ein kostengünstiges Meßverfahren zur Durchführung von Notfall- und Einzelbestimmungen vorgestellt. Dabei werden *in ein und derselben* Küvette und mit nur *einmaliger* Pipettierung von Reagenz *hintereinander* (konsekutiv) der Reagenzien-Leerwert-, der Proben-, der Standard- und der Kontrollserumansatz durchgeführt. Bei diesem konsekutiven Meß- und Pipettierverfahren werden im Vergleich zur aufeinanderfolgenden Durchführung der Proben-, Standard- und Kontrollserumansätze in separaten Küvetten insbesondere Reagenz und Küvetten eingespart. Das spezielle Anwendungsgebiet liegt bei vorkonfektionierten Küvettentests, bei denen dann bei konsekutivem Vorgehen die Gehaltsbestimmung in der Probe und im Kontrollserum sowie die zur Gehaltsbestimmung erforderliche Standardabsorption mit einem einzigen Küvettentest erfolgt.

Die aufgezeigten Ergebnisse der Glucose- und der Aspartataminotransferase-Bestimmung zeigen, daß dieses Konsekutiv-Meßverfahren prinzipiell möglich ist und sogar zu einer aussagekräftigeren Richtigkeitskontrolle führt. Ist der Meßbereich für eine Bestimmung infolge zu hoher Substanz-Konzentration/Aktivität oder aus photometrischen Gründen überschritten, zeigt der falsche Kontrollserumwert dies unmittelbar an. Diese Aussage kann bei herkömmlicher Durchführung mit 2 getrennten Ansätzen für die Probe und für das Kontrollserum nicht aus dem Kontrollserumwert geschlossen werden.

Consecutive spectrophotometric determinations in one cuvette:

A new approach for checking the accuracy of single, profile and emergency determination

Summary: A cost effective method for emergency and single assays is presented. By this method, a *serial* (consecutive) *determination* of reagent blank, sample, standard, and control serum is performed *in one single cuvette* and with *only one pipetting* of reagent. Compared to a sequential determination of sample, standard, and control serum, this is specially economical with regard to reagents and cuvettes. A particular application is seen in the field of pre-filled cuvette tests, where the consecutive method allows analysis in the sample and in the control serum, and determination of the required standard absorption in a single test.

The results found in the determination of glucose and of aspartate aminotransferase show that the consecutive measuring principle is feasible and even results in a more expressive control of accuracy. If the value found in the assay exceeds the measuring range due to too high a substance concentration or activity, or for photometry reasons, it is immediately seen from the incorrect value for the control serum. The same is not possible in the conventional technique, as it uses two separate tests for the sample and for the control serum.

Einführung

Einzel- und Notfallbestimmungen sind bei zuverlässiger Durchführung sehr zeitaufwendig und erfordern sehr viel Reagenz und Küvetten. So sind bei der Gehaltsbestimmung eines Substrates ein Reagenzien-Leerwert, ein Standard-, ein Proben- und ein Kontrollserum-Ansatz erforderlich. Wenn mit einem Faktor die Berechnung

durchgeführt werden kann, erübrigt sich der Standard-Ansatz. Bei der Durchführung von Enzym-Aktivitätsbestimmungen von einer einzigen Probe sind mindestens 2 Ansätze erforderlich (1 Proben-Ansatz, 1 Kontrollserum-Ansatz). Jeder Ansatz erfordert die Pipettierung eines bestimmten Volumens an Reagenz, die Benützung von verschiedenen Küvetten bzw. deren sorgfältige Säuberung (Verschleppungseffekt). Weiterhin können

bei der Pipettierung der Reagenzmengen und bei den erforderlichen Küvettenabgleichen für jeden Ansatz Fehler auftreten.

Werden Einzelbestimmungen auf ausgesprochen für die Notfall-Diagnostik bestimmten Geräten durchgeführt, so wird aus Kostengründen oftmals kein Kontrollserum mitgeführt. Die Berücksichtigung der Reagenzien-Leerwerte und die Faktorisierung mittels Standards zur Berechnung kann meistens nicht vor jeder Einzelbestimmung gesondert durchgeführt werden.

In vielen kleineren Laboratorien werden sogenannte Küvetten-Tests eingesetzt. Dabei ist für den Standard- und den Kontrollserum-Ansatz jeweils ein zusätzlicher, kostspieliger Küvetten-Test erforderlich. Die Berechnung und Kontrolle setzt zwingend voraus, daß sich die Reaktions- und die Reagenzbedingungen (Volumen, Küvettenqualität, Stabilität) völlig zwischen Proben-, Standard- und Kontrollserum-Ansatz gleichen.

Wir führen seit etwa 3 Jahren Versuche mit dem Ziel durch, die Praktikabilität der Durchführung von Einzelbestimmungen unter spezieller Berücksichtigung der Qualitätskontrolle zu vereinfachen und den Aufwand (Anzahl an Küvetten, Menge an Reagenz) pro Einzelbestimmung zu verringern.

Werden z.B. für eine Notfalluntersuchung (Notfallprofil) von einem Labor, das nicht mit speziellen, für die Notfall-Diagnostik bestimmten Geräten ausgerüstet ist, die Bestimmung von Glucose, Harnstoff, Alaninamino-transferase und Kreatinkinase verlangt, so sind vielmalige Reagenzpipettierungen und der Verbrauch bzw. die Säuberung von zahlreichen Küvetten und deren Abgleich erforderlich. Bei dem erwähnten Beispiel wären für die Glucose- und Harnstoff-Bestimmung bei Standardberechnung je 4 Ansätze (Reagenzien-Leerwert-, Standard-, Proben- und Kontrollserum-Ansatz) und für die Aktivitätsbestimmung von Alaninaminotransferase und Kreatinkinase je 2 Ansätze (Proben- und Kontrollserum-Ansatz) durchzuführen. Unter strenger Wahrung der Qualitätskontroll-Grundsätze sind für diese 4 Einzelbestimmungen 12 Küvetten bzw. 12malige Säuberung einer Küvette, sowie die Pipettierung von je viermal Reagenz für jede Substrat- und je zweimal Reagenz für jede Aktivitätsbestimmung notwendig.

Ziel unserer Arbeit war es, eine Möglichkeit für die Optimierung des Vorgehens bei Einzelbestimmungen unter möglichst weitgehender strenger Wahrung der Qualitätskontroll-Grundsätze zu suchen. Dabei stellten wir uns folgende Fragen:

1. Ist es möglich, die bisher parallel durchgeführten Ansätze für den Reagenzien-Leerwert, die Probe, den Standard- und das Kontrollserum *in ein und derselben* Küvette mit *ein und demselben* Reagenz, d.h. mit nur einmaliger Reagenzpipettierung *hintereinander* durchzuführen? Im obig erwähnten Beispiel käme man mit

4 Küvetten und nur 1maliger Pipettierung von Reagenz für jede Bestimmung aus.

2. Wie groß ist der Einfluß auf das Reaktionsgeschehen, wenn Proben, Standards und Kontrollserum im gleichen Reaktionsmilieu hintereinander pipettiert werden? Welchen Einfluß haben Matrix-Effekte?
3. Wie steht es mit der Aussagekraft der Qualitätskontrolle?
4. Wird der Linearitätsbereich zu sehr eingeschränkt?

Unsere Versuche zeigten, daß für zahlreiche Bestimmungen unser vorgeschlagenes Vorgehen anwendbar ist. Da die Absorptionsmessungen für die Probe nach derjenigen für den Reagenzien-Leerwert, die Absorptionsmessung für den Standard nach derjenigen der Probe und für das Kontrollserum nach derjenigen für den Standard erfolgen, bezeichnen wir die Bestimmung als Konsekutiv-Bestimmung.

Materialien und Reagenzien

Geräte

Als Geräte wurden entweder normale Photometer, z. B. das UVIKON 610 Spektralphotometer (Kontron AG, Zürich) oder das Eppendorf Spektrallinienphotometer, bzw. der (Cobas) Bio-Zentrifugalanalysator der Firma F. Hoffmann-La Roche + Co. AG eingesetzt.

Da der (Cobas) Bio eigentlich ein Parallelanalysator ist, waren einige manuelle Vorgehensschritte vorzunehmen, um Konsekutivmessungen zu ermöglichen. Der (Cobas) Bio wurde nur eingesetzt, um schneller und gleichzeitig zu umfangreicherem Datenmaterial für eine bessere statistische Aussage der Ergebnisse zu gelangen.

Die Konsekutiv-Bestimmungen bestehen in einem zweiten bzw. dritten Zusatz von einer Standard-Lösung bzw. Kontrollserum zu einem Reaktionsgemisch, welches die Probe schon enthält.

Vorgehen auf dem (Cobas) Bio mit manueller Pipettierung

Von den mehreren bestehenden Möglichkeiten wurden 3 ausgewählt:

- a) Im 1. Lauf wird Leerwert-Berücksichtigung (Blanking Mode) 0 bzw. 1 verwendet (d.h. Pipettierung und Messung durch den Apparat); im 2. Lauf wird auf Leerwerts-Berücksichtigung 2 bzw. 3 eingestellt.
- b) Der Apparat wird am Anfang der Versuche auf Leerwert-Berücksichtigung (Blanking Mode) 3 eingestellt und alle Volumina werden mit einer externen Pipette in die Analysenküvetten einpipettiert.

Dieses Vorgehen erlaubt nach jeder Reaktion ein Zupipettieren von Probe bzw. Standard. Bei Aktivitätsbestimmungen von Enzymen allerdings – bedingt durch die benötigte Pipettierzeit für die Proben (meistens etwa 10 Minuten für einen vollen Analysenröhrer) – kann dieses Vorgehen nicht allgemein empfohlen werden.

- c) Es wird angestrebt, alle Volumina vom Apparat pipettieren zu lassen.

Dieses Vorgehen erlaubt allerdings nicht, daß das Resultat der ersten Reaktion ausgedruckt werden kann, da die Bestimmung auf Analyseverfahren (Type of Analysis) 7 oder 3 (Start-Methode) durchgeführt werden muß: die 1. Reaktion läuft während der Inkubationszeit ab. Der Zusatz der 2. Probe erfolgt anstelle von Startreagenz.

Dadurch, daß in Blanking Mode 0 oder 1 gearbeitet wird, ist nur ein einziger Zusatz von Proben zum Reaktionsgemisch möglich.

Wenn bei der Konsekutiv-Bestimmung nur ein Kontrollserum zu den Reaktionsgemischen zugegeben wird (z. B. bei Enzymaktivitätsbestimmung: Probe + Kontrollserum-Ansatz), ist dieses Verfahren von der Seite der Geschwindigkeit der Bestimmung und der Präzision der Pipettierung vorteilhaft.

Reagenzien

Die Aspartataminotransferase-Bestimmung wurde mit den Reagenzien gemäß den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie (DGKCh) (1), die Glucose-Bestimmung mit der Hexokinase/Glucose-6-phosphatdehydrogenase-Methode (2) durchgeführt.

Als Reagenzien dienten Test-Kits von (Roche) Diagnostica. Die Reagenzien wurden – wenn nicht speziell erwähnt – gemäß den Angaben im Packungsprospekt aufgelöst. Die vorgenommenen Änderungen von Probe zu Reagenzverhältnis werden bei den einzelnen Bestimmungen mitgeteilt. Als Proben wurden Patienten- und Kontrollseren eingesetzt. (Moni-Trol® I und Moni-Trol® II: Kontrollseren von Merz + Dade; Precinorm: Kontrollseren von Boehringer Mannheim; Enzymkontrollserum N: F. Hoffmann-La Roche + Co. AG, Diagnostica).

Vorgehen

Bestimmung von Substratkonzentrationen

Nach herkömmlicher Methode sind bei exakter Analytik vier Ansätze durchzuführen:

1. Reagenzien-Leerwert-Ansatz.
2. Ansatz für Probe, deren Gehalt bestimmt werden soll.
3. Standard-Ansatz für die Berechnung.
4. Ansatz für das mitzuführende Kontrollserum.

Nach herkömmlicher Methode sind dazu notwendig: viermal Reagenz und – bei der Verwendung von Wegwerfküvetten – vier Küvetten. Wird diese Bestimmung nach der Konsekutiv-Bestimmungs-Methode durchgeführt, werden nur einmal Reagenz und eine einzige Küvette benötigt.

Die Messungen der Absorptionen und die Zeitpunkte für die konsekutiv zu pipettierenden Volumina erfolgte gemäß dem Schema in Abbildung 1.

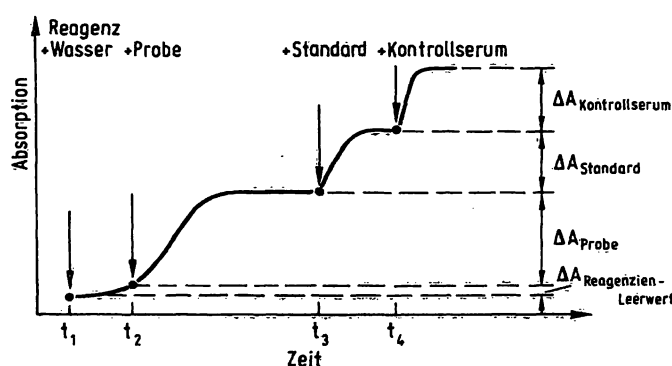


Abb. 1. Konsekutiv-Bestimmung.

Schema für die Absorptionsmessungen und die Zeitpunkte für die konsekutiv (hintereinander) pipettierten jeweils identischen Volumina für den Reagenzien-Leerwert, die Probe, den Standard und das Kontrollserum bei der Bestimmung der Glucose nach der Hexokinase/Glucose-6-phosphatdehydrogenase-Methode.

- t_1 = Zeitpunkt für die Pipettierung des Reagenzien-Leerwerts
 t_2 = Zeitpunkt für die Pipettierung der Probe
 t_3 = Zeitpunkt für die Pipettierung des Standards
 t_4 = Zeitpunkt für die Pipettierung des Kontrollserums

Die Berechnung des Gehaltes in der unbekannten Probe erfolgt nach den bekannten Formeln (ΔA = gemessene Absorptionsdifferenz, S = Standard, P = Probe):

$$\text{Berechnungsfaktor} = \frac{\text{Konzentration des Standards}}{\Delta A(S)} = F$$

$$\text{unbekannter Gehalt in der Probe} = F \times \Delta A(P)$$

$$\text{Gehalt in der Kontrollprobe} = F \times \Delta A(K)$$

Selbstverständlich muß bei den in die Formel eingesetzten Absorptionen den veränderten Volumenverhältnissen Rechnung getragen werden. Dies entfällt, wenn mit Küvetten, die longitudinal zum Strahlengang liegen, gearbeitet wird (3).

Bestimmung von Enzymaktivitäten

Bei exakter Durchführung werden bei einer Einzelbestimmung drei Ansätze benötigt: Der Reagenzien-Leerwert-Ansatz, der Proben-Ansatz und der Kontrollserum-Ansatz. Der Reagenzien-Leerwert-Ansatz wird oft weggelassen. In zwei bzw. drei Küvetten ist Reagenz zu pipettieren und anschließend in die Reagenzien-Leerwert-Küvette eine dem Probenvolumen entsprechende Menge an bidestilliertem Wasser, in die Proben-Küvette die Probe mit dem zu ermittelnden Gehalt und in die Kontrollserum-Küvette die entsprechende Menge an Kontrollprobe zu pipettieren.

Nach der Konsekutiv-Methode dagegen wird nur in eine Küvette das Reagenz pipettiert. Daran anschließend werden die der jeweiligen Probenmenge entsprechende Menge an Wasser für den Reagenzien-Leerwert (falls er mitgeführt werden soll) pipettiert und der Meßwert für den Reagenzien-Leerwert innerhalb der Meßzeit t_1 ermittelt. Anschließend wird die Probe pipettiert und innerhalb der Meßzeit t_2 der Meßwert für die Probe und den Reagenzien-Leerwert ermittelt. Daran schließend wird nun die Kontrollprobe pipettiert und innerhalb der Meßzeit t_3 die Summe der Meßwerte für den verbleibenden Reagenzien-Leerwert, für die Probe und für die Kontrollprobe ermittelt.

Die Ermittlung der Aktivität in der unbekannten Probe erfolgt folgendermaßen:

(Voraussetzung: die Größe des Reagenzien-Leerwertes ist für die gesamte Meßzeit konstant, d.h. zeitunabhängig. Da der Reagenzien-Leerwert i.a. klein ist, braucht er nicht berücksichtigt zu werden.)

- Meßwert 1 → Reagenzien-Leerwert
 Meßwert 2 → Reagenzien-Leerwert + Proben
 Meßwert 3 → Reagenzien-Leerwert + Proben + Kontrollproben
 Meßwert 3 – Meßwert 2 → Aktivität in der Kontrollprobe
 Meßwert 2 – Meßwert 1 → Aktivität in der unbekannten Probe

Selbstverständlich muß auch hierbei für die Berechnung der Aktivitäten den veränderten Volumenverhältnissen (verschiedene Endvolumina bei Meßwert 1, 2 und 3) Rechnung getragen werden, wenn nicht mit longitudinal zum Strahlengang liegenden Küvetten gearbeitet wird.

Wenn der ermittelte Gehalt in der Kontrollprobe dem Sollwert bzw. dem Sollwert + zulässige prozentuale Abweichung entspricht, wird der ermittelte Gehalt in der unbekannten Probe als richtig angesehen (Richtigkeitskontrolle). Die Kontrollprobe, die hierbei eine Richtigkeitskontrolle darstellt, könnte eventuell auch gleichzeitig als Präzisionskontrolle dienen. Jedoch sind nach den Richtlinien der Bundesärztekammer – in strenger Auslegung – bei der internen Qualitätskontrolle die Präzision und die Richtigkeit unabhängig voneinander durch zwei Kontrollproben zu prüfen.

Ergebnisse

Substrat-Bestimmungen (Glucose)

Vorbemerkungen

Die Konsekutiv-Bestimmungs-Methode ist an einige Voraussetzungen gebunden:

1. Das Verfahren setzt gute Absorptionsstabilitäten voraus, d.h. nach der Beendigung der Reaktion muß die Absorption des Reaktionsansatzes stabil sein.
2. Die Reaktionszeit sollte für eine Proben-Konzentration an der oberen Grenze des vorgesehenen Linearitätsbereiches 3–5 Minuten nicht überschreiten. Da die Standard- und Kontrollserum-Konzentration i.a. im Normalbereich liegen, reichen für diese, sich konsekutiv anschließenden Ansätze im allgemeinen 1–2 Minuten Reaktionszeit aus.
3. Die Probenmenge und der Linearitätsbereich sind so zu optimieren, daß der Linearitätsbereich des Photometers nicht überschritten wird. Durch die Wahl einer zweckmäßigeren Wellenlänge (z.B. 365 nm anstelle von 340 nm) bei NADH-Reaktionen kann der ausnutzbare Linearitätsbereich des Photometers verbessert werden.
4. Die bekannte Problematik der Berücksichtigung von eventuell erforderlichen Proben-Leerwerten, die allgemein bei allen Substrat-Bestimmungen auftritt, gilt auch für die Konsekutiv-Bestimmung. Für die Berücksichtigung der erforderlichen Proben-Leerwerte eignen sich bei Konsekutiv-Messungen besonders das sog. Autoblanking-Verfahren, die bi- bzw. trichromatischen Verfahren, die Wahl einer zweckmäßigen Wellenlänge und das Arbeiten mit großen Verhältnissen zwischen Reagenz und Probenvolumen.

Überprüfung der Absorptionsstabilitäten

Zur Überprüfung der Absorptionsstabilitäten und des ausnutzbaren Linearitätsbereichs des Photometers wurde vorerst nur mit wässrigen Lösungen gearbeitet und konsekutiv jeweils nach konstanter Reaktionszeit wiederum Probe zu dem Reaktionsgemisch hinzupipettiert. Insgesamt wurden viermal Probe zu dem gleichen Reagenzansatz pipettiert und die auftretenden Absorptionen gemessen. Aus Abbildung 2 gehen die Originaldaten hervor. Zu einem Reaktionsgemisch von Reagenz + einer Probe von 2,8 mmol/l (50 mg/dl), bzw. 11,1 mmol/l (200 mg/dl) Glucose wurden viermal hintereinander Proben von 5,6 mmol/l (100 mg/dl) Glucose eingesetzt und die auftretenden Absorptionsdifferenzen gemessen; sie sind in Abbildung 2 aufgezeichnet. In Tabelle 1 wurden noch weitere Konzentrationen, die in Abbildung 2 nicht gezeigt werden, aufgenommen. Aus Abbildung 2 und Tabelle 1 ergeben sich folgende Resultate:

1. Die bei der Hexokinase/Glucose-6-phosphatdehydrogenase-Methode auftretenden Absorptionsstabilitäten sind ausreichend für eine Konsekutiv-Messung.

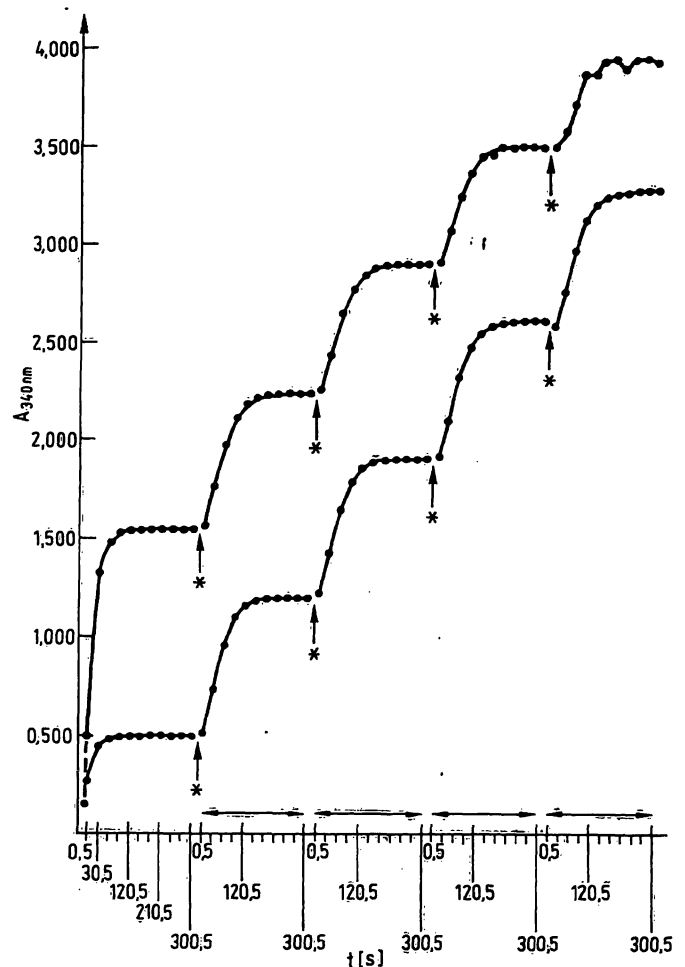


Abb. 2. Konsekutiv-Bestimmung.

Übersichtsversuch über die Absorptionsstabilitäten und die auftretenden Absorptionsdifferenzen, wenn zu einem Probe/Reagenzgemisch mit Proben-Glucose-Gehalt von 2,8 bzw. 11,1 mmol/l viermal hintereinander wässrige Proben mit einem Glucose-Gehalt von 5,6 mmol/l (100 mg/dl) hinzugefügt werden (*).
250 µl Reagenz + 5 µl (2,8 bzw. 11,1 mmol/l Glucose).
+ anschließend 4 × 5 µl (5,6 mmol/l Glucose).
Methode: Hexokinase/Glucose-6-phosphatdehydrogenase.
Gerät: (Cobas) Bio.

2. Die hintereinander durchgeführten Bestimmungen führen zu den gleichen Resultaten.
3. Die auftretenden Absorptionsdifferenzen sind konstant.
4. Wenn die Bestimmung der Glucose nach der Hexokinase/Glucose-6-phosphatdehydrogenase-Methode durchgeführt wird = i.a. treten schon bei der normal durchgeführten Bestimmung hohe Absorptionen auf – sollte mit einem zweckmäßig angepaßten Volumenverhältnis zwischen Proben- und Reagenzvolumen gearbeitet, bzw. nicht bei 340 nm, sondern bei 365 nm gemessen werden. Auch Arbeiten mit einer Schichtdicke von nur 0,5 cm bei orthogonal zum Strahlengang liegenden Küvetten vermeidet das Auftreten sehr hoher Absorptionen. So kann durch Wahl einer Schichtdicke von 0,5 cm und Meßwellenlänge 365 nm anstelle von 340 nm = ausreichender Gehalt

Tab. 1. Konsekutiv-Bestimmung.

Zu 8 Küvetten mit 250 µl Reagenz werden 8 verschiedene Konzentrationen an Glucose zugesetzt und nach Beendigung der Reaktion viermal hintereinander eine Probe mit 5,6 mmol/l Glucose zugesetzt.
250 µl Reagenz, 5 µl Probe, 5 µl Startreagenz (= konsekutiv pipettierte Probe).
Gerät: (Cobas) Bio.
Die Werte im rechten unteren Teil der Tabelle zeigen, daß der Meßbereich überschritten ist.

Normale Bestimmung + Konsekutiv-Bestimmung

Sollwert (mmol/l)	Gefundener Wert (mmol/l)	Gefundener Wert (mmol/l)			
		nach der 1. Zugabe	nach der 2. Zugabe	nach der 3. Zugabe	nach der 4. Zugabe
2,8	2,8	5,5	5,5	5,7	5,7
5,6	5,6	5,5	5,5	5,6	5,7
8,3	8,4	5,4	5,5	5,4	5,1
11,1	11,4	5,5	5,3	4,6	4,1
13,9	13,8	5,3	5,1	4,1	4,4
16,7	16,5	5,2	5,0	3,7	3,4
19,4	19,9	4,9	4,0	3,2	0,9
22,2	21,7	4,7	3,7	2,1	0,3

an NAD im Reaktionsgemisch vorausgesetzt — ein Faktor für die Linearitätsbereichserhöhung von $2 \times 1,85$ [Verhältnis: $A_{\text{NADH}}(340)$, $A_{\text{NADH}}(365)$] erhalten werden. Selbst bei einem Photometer mit einem Linearitätsbereich von nur $\approx 1,7$ Absorptionseinheiten könnte ein Gesamt-Linearitätsbereich für die Glucose-Bestimmung von ~ 35 mmol/l (630 mg/dl) erreicht werden. Bei der Durchführung einer Konsekutiv-Bestimmung würde für den unbekannten Gehalt der Probe ein Linearitätsbereich von $\sim 22,2$ mmol/l zu reservieren sein. Zuerst würde Probe pipettiert (Gehalt maximal bis 22,2 mmol/l (400 mg/dl), dann Standard 5 mmol/l (90 mg/dl) und zur Kontrolle ein Kontrollserum mit einem deklarierten Gehalt von kleiner als 7,8 mmol/l (140 mg/dl).

Überprüfung der Reaktionsgleichheit mit Kontrollseren

Tabelle 2 zeigt die Resultate der zweimaligen Hintereinander-Pipettierung des gleichen Kontrollserums nach jeweiliger Beendigung der Reaktion. Es ergibt sich keiner-

Tab. 2. Konsekutiv-Bestimmung.

Überprüfung der Reaktionsgleichheit mit Kontrollseren.

Bei 6 Kontrollseren wurde der Gehalt an Glucose bestimmt und anschließend noch zweimal das gleiche Kontrollserum hinzugefügt und die erhaltenen Resultate verglichen.

Als Proben wurden folgende Kontrollseren eingesetzt	Deklaration (mmol/l) Hexokinase-Methode	Gefundener Wert (mmol/l)		
		1. Bestimmung	+ Konsekutiv-Messung 1. Zugabe	2. Zugabe
Moni-Trol® I 159	4,77–5,33–5,88	5,3	5,3	5,4
Moni-Trol® II 60A	12,54–13,65–14,76	13,5	13,3	5,3
Precinorm U 721	5,44–6,05–6,66	5,2	5,8	5,6
Precipath U 701	10,99–11,71–12,43	11,3	11,7	6,4
Kontrollserum N (Roche) A2137	4,44–4,83–5,21	4,1	4,5	4,5
Kontrollserum P (Roche) A0438	11,99–12,88–13,77	11,6	12,2	8,2

Tab. 3. Konsekutiv-Bestimmung.

Überprüfung der Durchführbarkeit mit Patientenmaterial. Nach der Bestimmung des Glucosegehaltes der Probe wurde konsekutiv die Richtigkeitskontrolle durchgeführt. Die Berechnung erfolgt faktoriell. Dadurch wird der gesonderte Ansatz für die Richtigkeitsüberprüfung eingespart.

Kontrollserum: Moni-Trol®.

Deklarationswert: 4,8 – 5,3 – 5,9 mmol/l;
86 – 96 – 106 mg/dl.

Wert für Patientenserum (mmol/l)	(mg/dl)	Wert für Kontrollserum (mmol/l)	(mg/dl)
4,1	74,5	5,0	90,9
7,4	135,1	4,0	89,4
6,9	126,5	5,1	92,2
5,9	107,1	5,0	90,3
7,2	130,4	5,0	91,1
21,6	392,4	5,0	91,1
23,7	430,6	4,6	84 *
29,0	527,7	1,9	33,8**

* Hinweis, daß Probenwert an Grenze des Linearitätsbereiches.

** Anzeige, daß Linearitätsbereich überschritten, bzw. Reaktionszeit für die Gehaltsbestimmung in der Probe zu kurz.

lei Beeinflussung des Ergebnisses bei der Reaktion nach der 2. bzw. 3. Pipettierung. Voraussetzung ist allerdings, daß der Linearitätsbereich nicht überschritten wird.

Überprüfung der Durchführbarkeit mit Patientenmaterial

In den Tabellen 3 sind Ergebnisse der Konsekutiv-Bestimmung der Glucose aufgezeigt. In verschiedenen Patientenseren wurde der Glucose-Gehalt ermittelt und nach der Beendigung der Reaktion ein Kontrollserum zur Richtigkeitskontrolle hinzupipettiert, der Gehalt der Glucose in dem eingesetzten Kontrollserum ermittelt und mit den Sollwerten verglichen. Als Kontrollserum wurde Moni-Trol® I (Deklarationsbereich: 4,8 – 5,3 – 5,9 mmol/l, bzw. 86 – 96 – 100 mg/dl Glucose) eingesetzt. Die Berechnung erfolgte faktoriell. Die Tabelle zeigt, daß für die Richtigkeitsüberprüfung das Kontrollserum auch hintereinander (konsekutiv) zugesetzt werden kann. Dadurch wird ein spezieller

Ansatz (Küvette, Reagenz und dessen Pipettierung) eingespart.

Diese Art der Durchführung der Richtigkeitskontrolle ist sogar aussagekräftiger. So kann bei normaler paralleler Durchführung des Proben- und Kontrollserumansatzes die Kontrolle in Ordnung sein, jedoch infolge Reagenzinstabilität für die pathologische Probe der Linearitätsbereich nicht mehr ausreichen. Trotz Mitführen des Ansatzes für die Richtigkeitskontrolle wird der Gehalt in der Probe falsch bestimmt und nicht angezeigt. Bei konsekutiver Durchführung wird ein Überschreiten des Linearitätsbereichs dagegen sofort erkannt. Dies ist klar ersichtlich daran, daß der Kontrollserum-Wert zu tief ist. Liegt der Kontrollserum-Wert innerhalb des Deklarationsbereiches, kann der Linearitätsbereich für den Probengehalt nie überschritten sein. Es können lediglich seltene Fälle auftreten, bei denen wohl der Linearitätsbereich für die Probe ausreichend ist, jedoch nicht mehr ausreichend für die Gehaltbestimmung im Kontrollserum ist (vergleiche Tab. 3 den Wert mit *). Jedoch gibt dann der erhaltene Kontrollserum-

Wert beim Vergleich mit dem untersten Wert seines Deklarationsbereiches einen Hinweis, ob der erhaltene Probenwert an der Grenze des Linearitätsbereiches liegt, oder ob der Linearitätsbereich überschritten wurde.

Tabelle 4 zeigt Daten einer möglichen Präzisionskontrolle beim Konsekutiv-Verfahren. Bei allen Einzelbestimmungen wird nochmals das gleiche Volumen an Kontrollserum hinzugefügt und die Richtigkeitskontrolle konsekutiv durchgeführt. Aus dem Vergleich der erhaltenen Einzelwerte für das Kontrollserum ist auch ersichtlich, daß keine Beeinflussung des Kontrollprobenwertes durch das Reaktionsmilieu aufgetreten ist. Die konsekutiv erhaltenen Werte für das Kontrollserum können wie gewohnt in Präzisions-Kontrollkarten eingetragen und die Standardabweichungen sowie die Variationskoeffizienten bei genügender Anzahl von Kontrollserumwerten berechnet werden.

Enzym-Bestimmungen (Aspartataminotransferase)

Vorbemerkungen

Das Konsekutiv-Verfahren für Enzymbestimmungen ist im Vergleich zu Substratbestimmungen vom theoretischen Standpunkt aus als schwierig einzustufen.

Gründe:

1. Bei Enzym-Bestimmungen läuft die Reaktion (Probe + Reagenz) während der nachfolgenden Pipettierung des Kontrollserums weiter. Die Reaktion würde bis zum Verbrauch der wesentlichen Komponente im Reaktionssystem ablaufen. Daraus folgt, daß keine konstante Absorption nach der ersten Meßzeit besteht (wie bei den Substrat-Bestimmungen).
2. Die Wahl des richtigen Zeitintervalles für die 2. Bestimmung ist zu ermitteln.
3. Das Konsekutiv-Verfahren kann nur angewendet werden, wenn streng lineare Absorptions-Zeit-Kurven (nach der Lag-Phase bzw. Vorinkubationszeit) vorliegen. Diese Voraussetzung gilt z.B. nicht für die Lactatdehydrogenase- und Hydroxybutyratdehydrogenase-Bestimmung. Bei diesen Bestimmungen gibt es zu keinem Zeitintervall eine streng lineare Absorptions-Zeit-Kurve.
4. Das Verhältnis von eingesetztem Probenvolumen zu Reagenzvolumen kann von Bedeutung sein. In einigen Empfehlungen ist dieses Verhältnis vorgeschrieben. Da jedoch bei Konsekutiv-Meßverfahren – um einen ausreichenden Meßbereich zu haben – im allgemeinen kleinere Probenvolumina eingesetzt werden, dürften Probenvolumeneffekte einen geringeren Einfluß haben.

Überprüfung des Absorptionsverlaufes

Im Gegensatz zu Endpunktbestimmungen, bei welchen die Ergebnisse der Konsekutiv-Messungen direkt aus den

Tab. 4. Konsekutiv-Bestimmung.

Überprüfung der Durchführbarkeit mit Patientenmaterial. Berechnung des Mittelwertes und des Variationskoeffizienten für die konsekutiv durchgeführte Richtigkeitskontrolle (Präzisionsüberprüfung). Berechnung mit Hilfe eines Standards.

Probe-Nr.	„Normale“ Bestimmung		Qualitätskontrolle mittels Konsekutiv-Bestimmung	
	(mmol/l)	(mg/dl)	(mmol/l)	(mg/dl)
162	4,1	75	5,2	94,0
163	8,7	159	5,2	94,1
191*	8,6	152	5,3	95,8
176*	8,2	149	5,4	98,5
175	13,1	238	5,5	99,6
145**	—	—	5,3	96,1
168	7,6	138	5,4	97,7
160	19,2	349	5,2	94,5
180	6,1	111	5,4	98,0
167**	0,1	2	5,4	97,7
174	11,3	206	5,4	97,5
188*	7,6	138	5,3	96,4
Mittelwert			5,32	96,66
Variationskoeffizient			1,9%	
183	6,2	112	5,2	94,3
1285*	6,2	112	5,1	92,9
1147	3,9	70	5,3	96,2
1317*	4,4	80	5,4	98,1
1318	4,2	77	5,4	97,6
1195	4,4	80	5,4	98,0
1320	6,1	111	5,3	96,9
1213*	4,7	85	5,5	99,1
1153	3,6	66	5,3	96,1
1225	6,3	114	5,4	98,0
1227*	6,0	109	5,5	99,7
Mittelwert			5,33	96,98
Variationskoeffizient			2,1%	

* leicht ikterische Probe

** hämolytische Probe

jeweils auftretenden Absorptionsdifferenzen berechnet werden können, wird bei Enzymbestimmungen die Summe aller aktiven Bestandteile im Reaktionsgemisch bestimmt. Um den Wert der zuletzt zugegebenen Probe ermitteln zu können, müssen die Summen der Aktivitäten vor Zugabe dieser Probe berücksichtigt werden.

Die als Beispiel aufgeführte Aspartataminotransferase-Bestimmung wurde mit Reagenzien entsprechend den Empfehlungen der DGKCh durchgeführt. Gemäß diesen Empfehlungen wird kein bestimmtes Verhältnis zwischen Proben- und Reagenzvolumen zwingend vorgeschrieben.

Um die Proben/Reagenz-Verhältnisse bei der konsekutiven Zugabe von Probe und Kontrollserum nicht allzuviel zu verändern, werden 200 µl Reagenz mit 10 µl Probe bei der Hauptbestimmung gemischt.

Die Absorptionsmessungen zur Berechnung der Aktivitäten werden 50 Sekunden nach Zugabe der Proben begonnen. Nach 21 Messungen mit einem Zeitintervall von 10 Sekunden wird die Aktivität berechnet.

Bei der Konsekutiv-Messung wurden mehrmals erneut 10 µl Probe zu den Reagenzlösungen zupipettiert.

Es wurde eine Verdünnungsreihe (1/1, 2/3, 1/3, 1/6) eines Serums mit etwa 100 U/l hergestellt und als Probe eingesetzt. Zu der Hälfte der Proben wurden dreimal von der Verdünnung 1/3 (etwa 33 U/l) konsekutiv zugegeben und die resultierende Aktivität erneut ermittelt. Die bei diesen Untersuchungen erhaltenen Resultate sind in der Tabelle 5 dargestellt. Abbildung 3 zeigt den Absorptionsverlauf einiger dieser Ansätze.

Die Versuche wurden dreimal durchgeführt, jeder Wert ist ein Mittelwert aus 3 Ansätzen.

Zuerst wurde eine normale Bestimmung im Doppelansatz durchgeführt; nach den Absorptionsmessungen (21mal) im zeitlichen Abstand von 10 Sekunden wurde zu dem einen Ansatz (obere Hälfte der Tabelle 5) die Serumverdünnung 1/3 mit etwa 33 U/l konsekutiv zugesetzt (viermal). Zu dem anderen Ansatz wurde kein weiteres Probenvolumen hinzugefügt. Nach jedem Zusatz wurde die Aktivität bestimmt. Da bei dem einen Ansatz keine weitere Probe zugesetzt wurde, werden wiederum die gleichen Aktivitäten erhalten. Diese dienen zum Vergleich, ob während der ganzen Reaktionszeit die Aktivität konstant ist. Bei den Proben mit Konsekutiv-Zusatz wurde die Aktivität der jeweils hinzugesetzten Probe (Verdünnung 1/3) ermittelt. Sie ergibt sich für die 1. konsekutiv zugegebene Probe aus der Aktivität während der 2. Messung minus Aktivität während der 1. Messung. Für den 2. Zusatz ergibt sie sich aus der Aktivität während der 3. Messung minus Aktivität während der 2. Messung.

Aus der Tabelle ist — falls der Meßbereich nicht überschritten bzw. die Testkonzentration noch ausreichend waren — eine gute Konstanz der Aktivitäten ersichtlich. Es ist bei diesen Versuchen zu berücksichtigen, daß infolge der Durchführung von gleichzeitig sehr vielen Ansätzen die Zeitpunkte für die einzelnen konsekutiv zugesetzten Proben ungewöhnlich lange nach dem Start der 1. Reaktion lagen (vgl. Zeiten in Tabelle 5 und Abbildung 3). Bei Einzelbestimmungen ist der Effekt bedeutend geringer.

Tab. 5. Konsekutiv-Bestimmung.

Überprüfung des Absorptionsverlaufes. Vergleich der Aktivitäten bei Konsekutiv-Zusatz (obere Hälfte der Tabelle) und ohne Zusatz (untere Hälfte der Tabelle). Bei den Ansätzen im unteren Teil wurden immer wieder die Aktivitäten der ersten Probenzugabe bestimmt. Bei den Ansätzen mit Konsekutivzusatz ergeben sich die Aktivitäten der zugesetzten Probe aus den Differenzen zwischen der 2. und der 1. bzw. der 3. und der 2. Aktivitätsberechnung. Die Tabelle zeigt die gute Konstanz der Aktivität (etwa 33 U/l) der konsekutiv zugesetzten Probe im schon 'reagierenden' Reaktionsmilieu.

Normale Bestimmung			1. Hälfte des Rotors mit Konsekutiv-Zugabe von weiteren Proben: + dreimal Konsekutiv-Bestimmung									
Probe- Verdünnung	Versuchs-Nr.			1. Zugabe Versuchs-Nr.			2. Zugabe Versuchs-Nr.			3. Zugabe Versuchs-Nr.		
	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.
1/6	16	16	16	35	35	33	36	32	35	34	34	35
1/3	33	33	33	35	35	33	36	32	33	35	34	33
2/3	66	65	67	35	35	33	35	32	33	33	0	33
1	100	98	100	35	34	31	36	32	0	0	0	0
2. Hälfte des Rotors ohne Konsekutiv-Zugabe von weiteren Proben												
1 1/6	17	16	17	15	15	16	15	18	17	14	15	15
1/3	33	31	33	31	30	32	30	31	31	30	30	30
2/3	66	64	65	64	62	63	64	62	63	62	61	62
1	101	100	98	98	97	96	97	97	94	95	89	0
				Reaktionszeitpunkt								
Zugabe der Probe nach ~ Minuten				11			23			35		

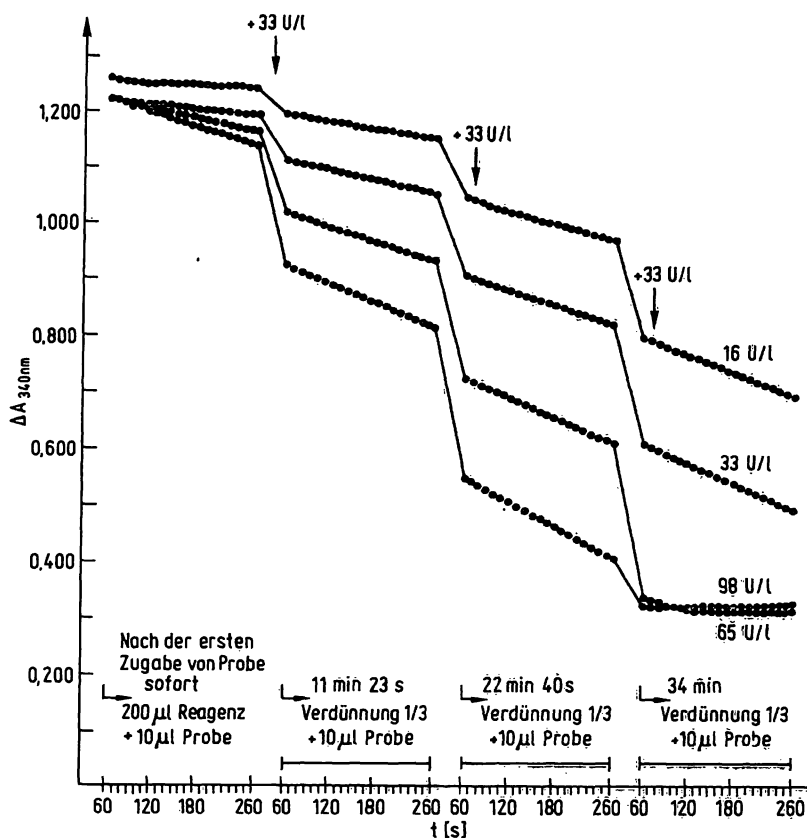


Abb. 3. Konsekutiv-Bestimmung.

Graphische Darstellung des Absorptionsverlaufes bei der Bestimmung der Aspartataminotransferase-Bestimmung nach Zusatz weiterer Probenmengen.

Probe:

Aktivität der 1. Messung

Aktivität der 2. Messung nach 1. Zusatz von 33 U/l:

Aktivität der 3. Messung nach 2. Zusatz von 33 U/l:

Aktivität der 4. Messung nach 3. Zusatz von 33 U/l:

200 µl Reagenz + 10 µl Probe mit jeweils 16, 33, 65, 98 U/l + daran anschließend 3 × 10 µl Probe mit 33 U/l.

Methode: DGKCh (1).

Gerät: (Cobas) Bio.

I	II	III	IV
16	33	65	98 U/l
51	68	100	132 U/l
83	100	132	134 U/l
117	134	—	— U/l

Überprüfung der Durchführbarkeit mit Patientenmaterial

In den Tabellen 6a, 6b und 6c sind einige Daten zur Durchführbarkeit der Richtigkeitskontrolle nach dem Konsekutiv-Verfahren dargestellt.

Bei verschiedenen Patientenproben mit unterschiedlichen Gehalten an Aspartataminotransferase werden nach der eigentlichen Einzel-Bestimmung noch das Kontrollserum zum Reaktionsgemisch hinzupipettiert und die Gesamt-Aktivität für die Probe plus das Kontrollserum bestimmt. Die Aktivität des Kontrollserums ergibt sich aus der Differenz der Aktivitätsmessungen der Probe plus Kontrollserum und der Aktivitätsmessung der Probe allein.

Bei den Werten der Tabelle 6a wurde nach der eigentlichen Bestimmung das Kontrollserum PreciNorm[®], bei 6b das Kontrollserum Moni-Trol[®] II und bei Tabelle 6c das Enzym-Kontrollserum N (Roche) konsekutiv zugesetzt. Aus den erhaltenen Werten für das Kontrollserum (= Differenz Aktivität II – Aktivität I) wurde die Präzision der Aktivitätsbestimmung in der Kontrollprobe

ermittelt. Diese Größe beinhaltet sowohl die Reproduzierbarkeit als auch einen möglichen Matrix-Effekt, der von der unbekannten zuerst pipettierten Probe herühren könnte. Zur Berechnung des Variationskoeffizienten wurden nur Werte innerhalb des Sollwertbereiches des Kontrollserums verwendet.

Die erhaltenen Werte für das hinzugesetzte Kontrollserum im Vergleich zu ihren Deklarationswerten zeigen, daß die konsekutive Durchführung der Richtigkeitskontrolle anwendbar ist. Durch dieses Vorgehen wird sowohl eine Zeit- als auch eine Kostenersparnis erreicht (keine 2. Küvette, kein zweites Mal Reagenz).

Diskussion

Die erhaltenen Resultate bei der Gehalts-Bestimmung der Glucose und der Ermittlung der Aspartataminotransferase-Aktivitäten zeigen, daß das Konsekutiv-Meßverfahren als eine mögliche Variante zur Richtig-

Tab. 6a. Konsekutiv-Bestimmung.
Überprüfung der Durchführbarkeit mit Patientenmaterial.
Nach der normalen Einzel-Bestimmung wurde das Kontrollserum: Precinorm U zugesetzt (Deklarationsbereich 25–29–33 U/l).

Patienten-Nr. der eingesetzten Serum	A. Zusatz von Precinorm U		Patienten-Nr. der eingesetzten Serum	B. Zusatz von Moni-Trol® II		Patienten-Nr. der eingesetzten Serum	C. Zusatz von Enzym-Kontrollserum N	
	Aktivität I (U/l)	Aktivität II (U/l)		Aktivität I (U/l)	Aktivität II (U/l)		Aktivität I (U/l)	Aktivität II (U/l)
1054	137,23	167,39	1054	137,20	174,06	1054	136,55	185,78
1083	130,62	159,36	1083	128,37	163,58	1083	128,62	178,28
1093	90,55	118,03	1093	92,53	128,55	1093	88,78	140,60
1126	51,25	80,08	1126	51,71	86,98	1126	51,60	102,91
1076	108,76	140,57	1076	109,91	141,75	1076	108,55	161,81
1173	45,35	71,46	1173	44,07	80,13	1173	44,42	98,73
1136	41,89	69,43	1136	40,57	78,55	1136	42,75	95,23
1131	35,57	60,99	1131	33,69	70,94	1131	34,82	87,16
1028	145,02	179,32	1028	145,51	184,18	1028	146,20	198,05
1011	39,49	65,44	1011	36,44	74,23	1011	37,55	90,53
1010	105,87	136,33	1010	104,71	142,00	1010	104,02	155,85
1265	84,60	112,64	1265	82,51	119,39	1265	83,71	130,76
1004	43,44	70,84	1004	41,40	79,76	1004	41,74	96,01
1178	59,87	89,32	1178	60,79	99,90	1178	59,27	114,50
1002	109,79	138,89	1002	109,61	145,61	1002	107,79	160,14
1081	119,87	147,19	1081	119,70	157,67	1081	118,77	171,88
1173	41,08	67,50	1173	40,26	76,75	1173	42,51	93,47
1092	81,88	108,08	1092	82,43	119,29	1092	81,25	133,50
1243	8,59	36,99	1243	8,12	47,71	1243	8,86	61,63
1074	42,16	70,73	1074	41,89	81,12	1074	44,56	96,38
Enzym-Kontrollserum N	50,74	80,30	Enzym-Kontrollserum N	49,95	88,49	Enzym-Kontrollserum N	50,23	102,69
	52,30	80,11		50,82	89,29		50,14	102,78
Moni-Trol® II	36,85	69,58	Moni-Trol® II	36,27	71,88	Moni-Trol® II	36,25	87,75
	35,71	68,35		35,86	73,15		37,11	87,09
Precinorm U	26,87	55,88	Precinorm U	26,09	67,16	Precinorm U	27,33	78,92
	gefundenen Mittelwert:	$\bar{x} = 28,78$		gefundenen Mittelwert:	$\bar{x} = 37,27$		gefundenen Mittelwert:	$\bar{x} = 51,96$
	tiefster Wert:	$= 25,42$		tiefster Wert:	$= 35,21$		tiefster Wert:	$= 49,23$
	höchster Wert:	$= 32,73$		höchster Wert:	$= 41,07$		höchster Wert:	$= 55,23$
		$s = 2,27$			$s = 1,83$			$s = 1,7107$
		VK = 7,9%			VK = 4,9%			VK = 3,29%

Tab. 6b. Konsekutiv-Bestimmung.
Überprüfung der Durchführbarkeit mit Patientenmaterial.
Nach der normalen Einzel-Bestimmung wurde das Kontrollserum: Moni-Trol® II zugesetzt (Deklarationsbereich 35–43–50 U/l).

Patienten-Nr. der eingesetzten Serum	A. Zusatz von Precinorm U		Patienten-Nr. der eingesetzten Serum	B. Zusatz von Moni-Trol® II		Patienten-Nr. der eingesetzten Serum	C. Zusatz von Enzym-Kontrollserum N	
	Aktivität I (U/l)	Aktivität II (U/l)		Aktivität I (U/l)	Aktivität II (U/l)		Aktivität I (U/l)	Aktivität II (U/l)
1054	137,23	167,39	1054	137,20	174,06	1054	136,55	185,78
1083	130,62	159,36	1083	128,37	163,58	1083	128,62	178,28
1093	90,55	118,03	1093	92,53	128,55	1093	88,78	140,60
1126	51,25	80,08	1126	51,71	86,98	1126	51,60	102,91
1076	108,76	140,57	1076	109,91	141,75	1076	108,55	161,81
1173	45,35	71,46	1173	44,07	80,13	1173	44,42	98,73
1136	41,89	69,43	1136	40,57	78,55	1136	42,75	95,23
1131	35,57	60,99	1131	33,69	70,94	1131	34,82	87,16
1028	145,02	179,32	1028	145,51	184,18	1028	146,20	198,05
1011	39,49	65,44	1011	36,44	74,23	1011	37,55	90,53
1010	105,87	136,33	1010	104,71	142,00	1010	104,02	155,85
1265	84,60	112,64	1265	82,51	119,39	1265	83,71	130,76
1004	43,44	70,84	1004	41,40	79,76	1004	41,74	96,01
1178	59,87	89,32	1178	60,79	99,90	1178	59,27	114,50
1002	109,79	138,89	1002	109,61	145,61	1002	107,79	160,14
1081	119,87	147,19	1081	119,70	157,67	1081	118,77	171,88
1173	41,08	67,50	1173	40,26	76,75	1173	42,51	93,47
1092	81,88	108,08	1092	82,43	119,29	1092	81,25	133,50
1243	8,59	36,99	1243	8,12	47,71	1243	8,86	61,63
1074	42,16	70,73	1074	41,89	81,12	1074	44,56	96,38
Enzym-Kontrollserum N	50,74	80,30	Enzym-Kontrollserum N	49,95	88,49	Enzym-Kontrollserum N	50,23	102,69
	52,30	80,11		50,82	89,29		50,14	102,78
Moni-Trol® II	36,85	69,58	Moni-Trol® II	36,27	71,88	Moni-Trol® II	36,25	87,75
	35,71	68,35		35,86	73,15		37,11	87,09
Precinorm U	26,87	55,88	Precinorm U	26,09	67,16	Precinorm U	27,33	78,92
	gefundenen Mittelwert:	$\bar{x} = 28,78$		gefundenen Mittelwert:	$\bar{x} = 37,27$		gefundenen Mittelwert:	$\bar{x} = 51,96$
	tiefster Wert:	$= 25,42$		tiefster Wert:	$= 35,21$		tiefster Wert:	$= 49,23$
	höchster Wert:	$= 32,73$		höchster Wert:	$= 41,07$		höchster Wert:	$= 55,23$
		$s = 2,27$			$s = 1,83$			$s = 1,7107$
		VK = 7,9%			VK = 4,9%			VK = 3,29%

keitskontrolle bei Einzel-, Profil- und Notfall-Bestimmungen angesehen werden kann.

Die Vorteile des Verfahrens liegen in der Zeit- und Kostenersparnis. Selbst bei Einzelbestimmungen, die direkt in der Küvette ausgeführt werden, sowie faktorieller Berechnungsmöglichkeit und Weglassen des Reagenzien-Leerwertes sind bei der Durchführung in der herkömmlichen Art mindestens 2 Ansätze erforderlich: Proben-Ansatz + Kontrollserum-Ansatz mit zwei verschiedenen Küvetten und zweimal Reagenz. Wenn dagegen die Einzel-Bestimmung nach dem Konsekutiv-Verfahren durchgeführt wird, wird nur eine einzige Küvette und nur einmal Reagenz benötigt.

Das Verfahren ist sehr einfach, jedoch sicherlich nicht auf alle analytischen Bestimmungsprinzipien übertragbar. Die Matrixverhältnisse sind sehr sorgfältig zu studieren. Aus diesem Grunde wurden bei uns bis zu 4 verschiedene Kontrollseren mit ganz unterschiedlicher Matrix und mögliche Störsubstanzen hintereinander und in unterschiedlicher Folge pipettiert und aus den auftretenden Absorptionsdifferenzen die Sollwerte ermittelt. Die ermittelten Werte lagen im allgemeinen stets im 'Sollwertbereich'. Inwieweit jedoch die in Tabelle 6a, 6b und 6c ermittelten Variationskoeffizienten allein durch die Präzision der Bestimmung oder noch durch einen möglichen Matrix-Effekt bedingt sind, kann nicht eindeutig entschieden werden. In den Tabellen 6a, 6b und 6c wurden bei den aufgeführten Daten jeweils auch eine Probe mitgenommen, bei der der Kontrollprobenwert außerhalb des Sollwertes lag (vgl. Tabelle 6a: Nr. 1028, als Kontrollprobe: Precinorm U; Tabelle 6b: Nr. 1076, als Kontrollprobe: Moni-Trol® II; Tabelle 6c: Nr. 1265, als Kontrollprobe: Enzymkontrollserum N (Roche)).

Bei den Substratbestimmungen mit Standardberechnungen kann eine mögliche Nachreaktion – bedingt durch unspezifische Komponenten und Störfaktoren – leicht erkannt werden. Der Standard wird nach der Probe pipettiert und seine entsprechende Standardabsorption könnte durch unspezifische Komponenten und Störsubstanzen verfälscht werden. Jedoch wird dann der entsprechende Kontrollprobenwert, der mit der falschen Standardabsorption berechnet wurde, zu hoch oder zu tief sein.

Ähnliches gilt für die Enzymaktivitätsbestimmungen: der entsprechende Kontrollprobenwert kommt zu hoch oder zu tief heraus. Eine falsche Befundausgabe infolge Akzeptanz der Kontrollprobe dürfte nicht möglich sein. Theoretisch möglich ist jedoch, daß wegen eines zu hohen oder zu tiefen Kontrollprobenwertes – infolge eines eventuellen Matrix-Effektes der Probe auf die Kontrollprobe – die Richtigkeit des Patientenwertes verneint wird, obwohl der Patientenwert richtig ist (vgl. Tabelle 6a Nr. 1028, Tabelle 6b Nr. 1076, Tabelle 6c Nr. 1265).

Weiterhin zu bemerken ist, daß in der Probe vorkommende Störsubstanzen, die bei herkömmlicher Durchführung nicht erkannt werden (Richtigkeitskontrolle und/oder Präzisionskontrolle sind in Ordnung), bei konsekutiver Durchführung erkannt werden können. Denn diese Störsubstanzen werden sicherlich auch auf die konsekutiv pipettierte Kontrollprobe einwirken und somit einen falschen Kontrollprobenwert (außerhalb des Sollwertbereiches) bewirken.

Die konsekutiv durchgeführte Richtigkeitskontrolle erscheint somit sogar aussagekräftiger, denn normalerweise wird ein Probenergebnis dann als richtig angesehen, wenn der Kontrollprobenwert in Ordnung ist. Ein eventuelles Überschreiten des Linearitätsbereiches, das Vorliegen sehr hoher Enzymaktivitäten (z. B. Alaninaminotransferase, Aspartataminotransferase) – wobei in einigen Fällen dabei mit dem herkömmlichen Vorgehen sehr tiefe Aspartataminotransferase-Werte gefunden werden – wird bei konsekutiv durchgeführter Qualitätskontrolle sofort und eindeutig erkannt. Der Kontrollserumwert kommt zu niedrig heraus.

Bei Durchführung einer Einzelbestimmung nach dem Konsekutiv-Verfahren mit strenger Wahrung der Qualitätskontroll-Kriterien werden insbesondere bei den sog. Küvetten-Tests größere Sicherheiten erreicht. Die Kostenreduktion ist beträchtlich. Anstelle von 3 Einzeltests (1 Küvetten-Test für die Probe, 1 Küvetten-Test für den Standard, 1 Küvetten-Test für das Kontrollserum) wird nur noch ein einziger benötigt. Auch die Anforderungen an die 'Gleichheit' der Einzel-Küvetten-Tests (Küvettenqualität, dosiertes Reagenz-Volumen, Stellung der Küvette im Photometer) brauchen nicht so extrem gefordert zu werden.

Tab. 7. Ablauf der Bestimmung.

- Inhalt der Küvette mit 2 ml Wasser auflösen,
- Einbringen der Küvette ins Photometer, Absorption auf 0 stellen,
- 10 µl Probe pipettieren,
- nach etwa 3 min Absorption A_1 messen,
- 10 µl Standard hinzupipettieren,
- nach etwa 1,5 min Absorption A_2 messen,
- 10 µl Kontrollserum hinzupipettieren,
- nach etwa 1,5 min Absorption A_3 messen.

Als Probe wurde eingesetzt: Moni-Trol® II

(Deklaration: 12,9–14,3–15,8 mmol/l).

Standard: 5 mmol/l.

Kontrollserum: Hyland I (Deklaration: 3,8–4,1–4,5 mmol/l)

Gemessene Absorptionen: $A_1 = 0,300$ (von einer Volumenkorrektur wurde abgesehen)

$A_2 = 0,407$

$A_3 = 0,492$

$\Delta A_{\text{Probe}} = A_1 = 0,300$

$\Delta A_{\text{Standard}} = A_2 - A_1 = 0,107$

$\Delta A_{\text{Kontrollserum}} = A_3 - A_2 = 0,085$

Konzentration der Probe = $\frac{0,300}{0,107} \times 5 = 14,02 \text{ mmol/l}$

Konzentration des Kontrollserums = $\frac{0,085}{0,107} \times 5 = 3,97 \text{ mmol/l}$

Tabelle 7 zeigt ein Beispiel eines Küvettentests. Unter Verwendung nur einer einzigen Küvette wird der Gehalt der Probe (als Probe wurde Moni-Trol® II genommen) mit Hilfe eines Standards, der konsekutiv an 2. Stelle pipettiert wird, ermittelt. Nach der Standardabsorptionsmessung erfolgt die Pipettierung des Kontrollserums für die Qualitätskontrolle.

Zweifelsohne sind gewisse Modifikationen bezüglich der Reagenzienkomponenten und deren Konzentration durchzuführen, um die Reaktionsgeschwindigkeiten und die Linearitätsbereiche zu optimieren. Durch Auswahl der entsprechenden Methodologie, Erhöhung der Empfindlichkeiten der eigentlichen Reaktion und Wahl eines zweckmäßigen Verhältnisses zwischen

Proben- und Reagenzvolumen ist auch das Problem der Proben-Leerwerte lösbar.

Die bisher durchgeführten zahlreichen Versuche — Gegenstand einer späteren Publikation — zeigen, daß das konsekutive Meßverfahren bei folgenden Bestimmungen möglich ist: Cholesterin (Cholesterinoxidase/Cholesterinesterase/*Trinder*-Reaktion), Triglyceride (Lipase/Glycerinphosphatoxidase/*Trinder*-Reaktion), Harnsäure (Uricase/Aldehyddehydrogenase), Alaninaminotransferase, Kreatinkinase.

Das Konsekutiv-Meßverfahren stellt somit eine vielseitig anwendbare und interessante Alternativmöglichkeit zur zuverlässigen Durchführung von Einzel-, Notfall- und Profilbestimmungen dar.

Literatur

1. Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie, *Z. klin. Chem. klin. Biochem.* **8**, 658–660 (1970); **10**, 182–192 (1972).
2. Bondar, R. J. L. & Mead, D. C. (1974) *Clin. Chem.* **20**, 586–590.

3. Eisenwiener, H. G. & Keller, M. (1979) *Clin. Chem.* **25**, 117–121.

Dr. H. G. Eisenwiener
Forschungs- und Entwicklungsabteilung
F. Hoffmann-La Roche + Co. AG
Diagnostica
CH-4002 Basel

